

GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit

Zestaw do izolacji DNA ze śladów biologicznych

● **kat. nr. E3510**

EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23



Spis treści

Uwagi wstępne.....	3
Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika	3
Protokół.....	4
I. Aktywacja minikolumn wiążących DNA.....	4
II. Przygotowanie materiału	4
A. 1-100 µl krwi	4
B. Plamy krwi, śliny, nasienia i innych płynów biologicznych.....	4
C. Korzenie i trzony włosów, paznokcie	5
D. Filtry papierosów, gumy do żucia	5
E. Fragmenty tkanek.....	5
F. Fragmenty tkanek utrwalonych w parafinie.....	6
G. Fragmenty tkanek utrwalonych w formalinie	6
H. Mocz	6
III. Izolacja DNA.....	7
Środki ostrożności.....	9

Składniki zestawu	25 izolacji E3510-01	100 izolacji E3510-02	Warunki przechowywania
Buffer BT	0.9 ml	3.6 ml	15-25°C
Lyse BT	11 ml	42 ml	15-25°C
Proteinase K (20 mg/ml)	0.6 ml	2.4 ml	-20°C
Sol BT	11 ml	42 ml	2-8°C
Wash BTX1	15 ml	60 ml	15-25°C
Wash BTX2	15 ml	60 ml	15-25°C
Elution	3 ml	12 ml	15-25°C
DNA Binding Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	15-25°C
Filtration Columns	25 szt.	2 x 50 szt.	15-25°C
Protokół	1	1	

Uwagi wstępne

UWAGA 1 • Przeznaczenie zestawu. Zestaw Bio-Trace umożliwia izolację DNA ze śladowych ilości różnorodnych próbek biologicznych, np.: krwi świeżej lub mrożonej, płam krwi, śliny, nasienia, korzeni i trzonów włosowych, paznokci, filtrów papierosów, gum do żucia, fragmentów tkanek, moczu.

UWAGA 2 • Maksymalna ilość użytego materiału. Ogólna pojemność minikolumny to 25 µg DNA. Maksymalna objętość płynu nanoszonego na minikolumnę to 650 µl.

UWAGA 3 • Przechowywanie komponentów zestawu. Po rozpakowaniu, zestaw należy przechowywać w temperaturze pokojowej, za wyjątkiem buforu Sol BT oraz Proteiny K. Bufor Sol BT należy przechowywać w 2-8°C, natomiast Proteinazę K w -20°C.

UWAGA 4 • Dodatkowe zalecenia. Lizaty tkanek charakteryzują się dużą lepkością, co może powodować spowolnione filtrowanie lizatu przez złożo. Z tego względu zaleca się sprawdzanie czy cały lizat oraz kolejne płukania zostały całkowicie przefiltrowane przez złożo i ewentualne kontynuowanie wirowania do zakończenia filtrowania.

UWAGA 5 • Dobra praktyka laboratoryjna. Wszelkie roztwory z zestawu do oczyszczania DNA należy przechowywać szczelnie zamknięte, aby uniknąć zmiany stężeń w wyniku parowania. Dla otrzymania DNA o wysokiej czystości istotne jest dokładne stosowanie się do zaleceń protokołu.

Wyposażenie i odczynniki dostarczane przez użytkownika

- Mikrowirówka, rękawiczki, pipety, jałowe tipsy, jałowe probówki 1.5-2 ml, blok grzejny pozwalający na inkubację próbki w temperaturze do 70°C.
- 1M DTT, alkohol etylowy [96-100% v/v], ksilen i PBS. Aby przygotować bufor PBS należy: rozpuścić 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ i 0,24 g KH₂PO₄ w 800 ml H₂O. Doprowadzić pH do 7,4 za pomocą HCl i uzupełnić H₂O do 1000 ml. Wyjałowić.

Protokół

I. Aktywacja minikolumn wiążących DNA

1. Dodać 30 µl buforu aktywacyjnego **Buffer BT** do **minikolumny wiążącej DNA (DNA binding spin-column)**. Pozostawić w temperaturze pokojowej (nie wirować) do momentu naniesienia lizatu na minikolumnę.
 - *Dodanie buforu aktywacyjnego Buffer BT centralnie na powierzchnię membran zapewnia kompletne nasączenie membran buforem aktywacyjnym i uzyskanie maksymalnej wydajności wiązania DNA.*
 - *Aktywację należy wykonać przed rozpoczęciem procedury izolacji DNA.*

II. Przygotowanie materiału

A. 1-100 µl krwi

1. Do probówki typu Eppendorf 2 ml dodać: 1-100 µl świeżej lub mrożonej krwi, 250 µl buforu **Lyse BT** i 10 µl **Proteinase K**.
 - *Gdy objętość próbki jest mniejsza niż 100 µl, uzupełnić przy użyciu PBS do całkowitej objętości 100 µl.*
2. Wymieszać przez parokrotne odwrócenie probówki.
3. Przejść do punktu 1. części III. protokołu izolacji DNA.

B. Plamy krwi, śliny, nasienia i innych płynów biologicznych

1. Wyciąć fragment materiału poplamiony krwią, śliną, bądź nasieniem (nie przekraczać 1 cm²). Pociąć fragment na mniejsze kawałki. Umieścić pocięte skrawki materiału w probówce typu Eppendorf 2 ml. Plamy z podłoża twardych zeszkobać i wsypać do probówki.
2. Dodać 350 µl buforu **Lyse BT** i 10 µl **Proteinase K**. W przypadku plamy nasienia dodać dodatkowo 20 µl 1 M DTT.
3. Wymieszać dokładnie przez odwracanie i inkubować 60 min w 56°C, mieszając przez odwracanie co ok. 15 min.
4. Przejść do punktu 1. części III. protokołu izolacji DNA.

C. Korzenie i trzony włosów, paznokcie

- Odciąć 0.5-1 cm fragmenty włosów wraz z korzeniami lub pociąć trzony włosowe na kawałki o długości do 0.5-1 cm (w przypadku próbki bez korzeni).
 - Paznokcie pociąć na drobne kawałki (poniżej ok. 2 mm²).
- Umieścić pocięte włosy (nie więcej niż 20 mg) lub paznokcie w probówce typu Eppendorf 2 ml. Dodać 350 µl buforu **Lyse BT**, 20 µl 1 M DTT i 20 µl **Proteinase K**.
- Wymieszać dokładnie przez odwracanie lub worteksowanie próbówki i odwirować celem osadzenia włosów lub paznokci na dnie próbówki. Inkubować korzenie lub trzony włosowe przez co najmniej 60 min w 56°C (do całkowitego strawienia włosów), mieszając przez odwracanie co ok. 30 min. W przypadku paznokci zaleca się całonocną inkubację.
 - W przypadku izolacji DNA z włosów zawierających korzenie należy zwracać uwagę, aby korzenie włosowe były zawieszane w buforze do lizy. W razie potrzeby zanurzyć części włosów zawierających korzenie w buforze do lizy za pomocą jałowego tipsa.
- Przejdź do punktu 1. części III. protokołu izolacji DNA.

D. Filtry papierosów, guma do żucia

- Zdjąć bibułę z filtra papierosowego, pociąć na drobne kawałki i umieścić w probówce typu Eppendorf 2 ml.
lub
 - Fragment gumy do żucia (nie przekraczać 50 mg) pociąć na drobne kawałki i umieścić w probówce typu Eppendorf 2 ml.
- Dodać 350 µl buforu **Lyse BT** i 10 µl **Proteinase K**.
- Wymieszać dokładnie przez odwracanie lub worteksowanie próbówki i inkubować 60 min w 56°C, mieszając przez odwracanie co ok. 15 min.
- Przejdź do punktu 1. części III. protokołu izolacji DNA.

E. Fragmenty tkanek

- Pociąć fragment tkanki (nie więcej niż 10 mg) na drobne kawałki i umieścić w probówce typu Eppendorf 2 ml. Zawiesić rozdrobnioną tkankę w 350 µl buforu **Lyse BT**. Dodać 20 µl Proteinase K.
- Wymieszać dokładnie przez odwracanie lub worteksowanie próbówki i inkubować 3-6 h w 56°C, mieszając przez odwracanie co ok. 30 min.
 - Po inkubacji zawieszona tkanka powinna być całkowicie strawiona, w przeciwnym razie inkubację należy kontynuować do całkowitego strawienia tkanki.
- Przejdź do punktu 1. części III. protokołu izolacji DNA.

F. Fragmenty tkanek utrwalonych w parafinie

1. Fragment tkanki utrwalony w parafinie (nie więcej niż 25 mg) pociąć na drobne kawałki i umieścić w probówce typu Eppendorf 2 ml.
2. Dodać 1 ml ksylenu. Dokładnie wymieszać przez worteksowanie probówki. Inkubować 15 min w temperaturze pokojowej.
3. Wirować przez 3 min z prędkością 11 000 x g. Wybrać ostrożnie supernatant znad osadu.
4. Do osadu dodać 1 ml ksylenu, wymieszać przez worteksowanie.
5. Wirować przez 3 min z prędkością 11 000 x g. Wybrać supernatant znad osadu.
6. Do osadu dodać 1 ml 96% etanolu. Wymieszać przez worteksowanie lub odwracanie probówki.
7. Wirować przez 3 min z prędkością 11 000 x g. Wybrać supernatant znad osadu.
8. Powtórzyć etapy 6-7.
9. Inkubować otwartą probówkę w 37°C do momentu całkowitego odparowania etanolu (ok. 15 min).
10. Zawiesić próbkę w 350 µl buforu Lyse BT. Dodać 20 µl Proteinase K.
11. Kontynuować procedurę od punktu 2. protokołu E. Fragmenty tkanek.

G. Fragmenty tkanek utrwalonych w formalinie

1. Fragment tkanki utrwalony w formalinie przepłukać dwukrotnie w buforze PBS.
2. Pociąć fragment tkanki (nie więcej niż 25 mg) na drobne kawałki i umieścić w probówce typu Eppendorf 2 ml. Zawiesić rozdrobnioną tkankę w 350 µl buforu Lyse BT. Dodać 20 µl Proteinase K.
3. Kontynuować procedurę od punktu 2. protokołu E. Fragmenty tkanek.

H. Mocz

1. Do probówki typu Eppendorf 2 ml dodać 2 ml moczu.
2. Zwirować mocz w mikrowirówce przez 2 min z prędkością 6 000 x g.
3. Ostrożnie wybrać supernatant. Do osadu dodać 350 µl buforu Lyse BT, 20 µl 1 M DTT i 10 µl Proteinase K.
4. Worteksować przez 15 s.
5. Inkubować 60 min w 56°C, mieszając przez odwracanie co ok. 15 min.
6. Przejść do punktu 1. części III. protokołu izolacji DNA.

III. Izolacja DNA

1. Dodać 350 µl buforu **Sol BT** i dokładnie wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie probówki.
2. Inkubować 10 min w 70°C.
3. W przypadku próbek materiałów biologicznych wymienionych w sekcjach:
A nie dodawać etanolu (96-100%)
B, D, H dodać 180 µl etanolu (96-100%)
C dodać 230 µl etanolu (96-100%)
E, F, G dodać 350 µl etanolu (96-100%)
4. Dokładnie wymieszać przez kilkukrotne odwrócenie probówki.
5. Wirować przez 2 min z prędkością 12 000 x g.
6. Przenieść 600 µl supernatantu do **minikolumny wiążącej DNA (DNA binding spin-column)**, znajdującej się w probówce odbierającej. W przypadku izolacji DNA z plam krwi, śliny, nasienia zaschniętych na materiale, przenieść lizat (znad materiału) do **minikolumny wiążącej DNA** (nie przekraczać 600 µl), znajdującej się w probówce odbierającej. Nasączony materiał i pozostałość supernatantu przenieść do **minikolumny filtracyjnej (filtration spin-column)** celem odzyskania pozostałości lizatu. Wirować **minikolumnę filtracyjną** przez 2 min z prędkością 11 000 x g. Przesącz zachować do dalszej części procedury izolacji DNA.
7. Wirować **minikolumnę wiążącą DNA** przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
 - o W przypadku niecałkowitego przefiltrowania lizatu przez złożę wirowanie należy kontynuować.
8. Wyjąć minikolumnę, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
9. Przenieść pozostałość supernatantu lub przesącz z **minikolumny filtracyjnej** do **minikolumny wiążącej DNA**, znajdującej się w probówce odbierającej. Powtórzyć wirowanie przez 2 min z prędkością 11 000 x g celem przefiltrowania pozostałości lizatu przez złożę.
 - o W przypadku niecałkowitego przefiltrowania lizatu przez złożę wirowanie należy kontynuować.
10. Wyjąć **minikolumnę wiążącą DNA**, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.
11. Dodać 500 µl buforu płuczającego **Wash BTX1** do **minikolumny wiążącej DNA** i wirować przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
12. Wyjąć **minikolumnę wiążącą DNA**, wylać przesącz i umieścić minikolumnę z powrotem w probówce odbierającej.

13. Dodać 500 µl buforu płuczącego **Wash BTX2** do **minikolumny wiążącej DNA** i wirować przez 2 min z prędkością 11 000 x g.
- Podczas wyjmowania minikolumny zwrócić szczególną uwagę aby nie zanieczyścić próbki buforem płuczącym. Jeżeli minikolumna nie jest całkowicie sucha, wyłączyć przesącz, umieścić ją w probówce i ponownie wirować przez 1 min.
14. **Minikolumnę wiążącą DNA** umieścić w nowej probówce typu Eppendorf 1.5-2 ml. Dodać 50 µl buforu **Elution**.
- Dodanie buforu eluującego centralnie na powierzchnię membrany zapewnia uzyskanie maksymalnej wydajności odzysku DNA. Należy unikać dotykania ścianek minikolumn mikropipetą, aby nie przenosić śladów DNA pomiędzy kolejnymi minikolumnami.
 - W celu podniesienia wydajności odplukania z membran DNA genomowego można bufor Elution ogrzać do temp. 80°C.
 - Do elucji DNA można używać:
 - Buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0
 - Buforu TE, pH 8.0-9.0 (nie zalecany w przypadku sekwencjonowania DNA)
 - Innych buforów do celów specjalnych, o pH i stężeniu soli zbliżonych do buforu 5-10 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0.
15. **Minikolumnę wiążącą DNA** pozostawić na 5 min w temperaturze pokojowej.
16. Wirować minikolumnę przez 1 min z prędkością 11 000 x g.
17. Usunąć **minikolumnę wiążącą DNA**, zamknąć probówkę. DNA jest gotowe do dalszych analiz/manipulacji, może być przechowywane w 2-8°C lub zamrożone w -20°C.

Środki ostrożności

Buffer BT



Niebezpieczeństwo

H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.

H318 Powoduje poważne uszkodzenie oczu.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P260 Nie wdychać par/rozpylonej cieczy.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P310 Natychmiast skontaktować się z lekarzem.

Lyse BT



Uwaga

H319 Działa drażniąco na oczy.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Sol BT



Uwaga

H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

EUH032 W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.

Proteinase K



Niebezpieczeństwo

H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

Wash BTX1



Uwaga

H226 Łatwopalna ciecz i pary.
H302+H332 Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania.

H315 Działa drażniąco na skórę.

H319 Działa drażniąco na oczy.



P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.

P261 Unikać wdychania par/ rozpylonej cieczy.

P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P301+P312 W przypadku połknięcia: w przypadku złego samopoczucia skontaktować się z ośrodkiem zatruc/ lekarzem.

P304+P340 W przypadku dostania się do dróg oddechowych: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

Wash BTX2



Niebezpieczeństwo

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.

H319 Działa drażniąco na oczy.

P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, źródeł iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Nie palić.



P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.

P337+P313 W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

P403+P235 Przechowywać w dobrze wentylowanym miejscu. Przechowywać w chłodnym miejscu.

- **GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit jest przeznaczony do szybkiej izolacji DNA komórkowego (genomowego i mitochondrialnego) ze śladów biologicznych (w szczególności będących przedmiotem zainteresowania medycyny sądowej), np.: krwi świeżej lub mrożonej, plam krwi, śliny, nasienia, włosów, paznokci, filtrów papierosów, gum do żucia, fragmentów tkanek, moczu.**

Zestaw zapewnia wydajne oczyszczanie DNA zarówno z próbek świeżo pobranych jak i wieloletnich, wysuszonych lub zakonserwowanych, np. w alkoholu czy formalinie. Oczyszczone DNA nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe.

W trakcie izolacji DNA próbka poddana zostaje solubilizacji/lizie w obecności buforów stymulujących dezintegrację pozostałości struktur tkanek i komórek oraz ochraniających DNA samoistnie uwolnione w trakcie postępującego rozkładu starszych próbek. Solubilizacja próbki wspomagana jest proteolizą.

Proteinaza K catkownie degradowuje białka komórkowe, w tym białka wiążące DNA i nukleazy. Dodanie specjalnego buforu oraz etanolu wytwarza warunki do selektywnego wiązania DNA do złoża GeneMATRIX. Podczas krótkiego wirowania następuje wiązanie DNA do złoża, natomiast niezwiązane zanieczyszczenia pozostają w wycieku z kolumny. Ich śladowe pozostałości na złożu są skutecznie usuwane w trakcie dwóch etapów płukania. Elucję oczyszczonego DNA wykonuje się buforem niskosolnym, np.: zawierającym Tris-HCl, TE lub wodą destylowaną. Oczyszczony preparat DNA nadaje się do bezpośredniego użytku. Nie wymaga dalszej precypitacji etanolem.

- **GeneMATRIX to syntetyczne membrany nowej generacji wiążące DNA i RNA, wykorzystujące selektywne właściwości wiązania kwasów nukleinowych przez kompozytowy SiO_2 . W celu osiągnięcia wysokiej wydajności i czystości otrzymanych kwasów nukleinowych, opracowano wyspecjalizowane bufony wiążące i płuczące, projektowane pod kątem optymalnego wykorzystania właściwości nowych membran.**

Zastosowanie gotowych do użycia membran, umieszczonych w kolumnkach wirowniczych (ang. Spin-format) w połączeniu ze specjalną konstrukcją naszych minikolumn, istotnie poprawia jakość uzyskanego preparatu DNA lub RNA. Celem monitorowania kompletnego wymieszania roztworów oraz ułatwienia procedury izolacji DNA, część roztworów wyznakowano barwnikami.

W efekcie przekazujemy w Państwa ręce zestawy składające się z nowych złożeń i buforów reakcyjnych, których użycie gwarantuje szybkie, proste, bezpieczne i jednocześnie wydajne otrzymanie ultraczystych

kwasów nukleinowych. Uzyskane DNA lub RNA nadaje się bezpośrednio do zastosowań w technikach biologii molekularnej, m.in.: trawienia enzymami restrykcyjnymi, defosforylacji/fosforylacji, ligacji, badań oddziaływania białko-DNA, sekwencjonowania, blottingu, translacji *in vitro*, otrzymywania cDNA, hybrydyzacji. Dodatkową zaletą zestawów jest powtarzalność właściwości zarówno membran jak i buforów wiążących, ponieważ przygotowanie komponentów odbywa się w EURx sp. z o.o.



EURx Ltd. 80-297 Gdansk Poland
ul. Przyrodnikow 3, NIP 957-07-05-191
KRS 0000202039, www.eurx.com.pl
orders: email: orders@eurx.com.pl
tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

